



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

8 FW

In re Patent Application of

SHINKAWA et al

Atty. Ref.: 249-201

Serial No. 09/970,154

Group: 1644

Filed: October 4, 2001

Examiner: Saunders

For: METHOD FOR PURIFYING ANTIBODY

* * * * *

February 24, 2005

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

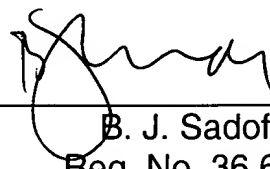
It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
2000-308254	Japan	6 October 2000

Respectfully submitted,

NIXON & VANDERHYE P.C.

By: _____



B. J. Sadoff
Reg. No. 36,663

BJS:pp
1100 North Glebe Road, 8th Floor
Arlington, VA 22201-4714
Telephone: (703) 816-4000
Facsimile: (703) 816-4100

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 0 年 1 0 月 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 0 - 3 0 8 2 5 4
Application Number:

ST. 10/C] : [J P 2 0 0 0 - 3 0 8 2 5 4]

願 人
plicant(s): 協和醗酵工業株式会社

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年 6 月 1 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 5 2 3 0 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 H12-1601Q3

【提出日】 平成12年10月 6日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 B01D 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

 【氏名】 新川 豊英

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

 【氏名】 内田 和久

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

 【氏名】 山▲崎▼ 基生

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

 【氏名】 庄司 絵美

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

 【氏名】 設楽 研也

【特許出願人】

 【識別番号】 000001029

 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

 【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗体を精製する方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いて所望の性質を有する抗体を精製する方法。

【請求項 2】 糖鎖が、N-グリコシド結合糖鎖である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 N-グリコシド結合糖鎖が、バイセクティングN-アセチルグルコサミン、フコースまたはガラクトースが結合した糖鎖である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 糖鎖に対し親和性を有する物質が、レクチンであることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 レクチンが、コンカナバリンA、小麦胚芽レクチンおよびレンズマメレクチンからなる群から選ばれる少なくとも 1 種類のレクチンである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 糖鎖に対し親和性を有する物質を結合させた担体が、合成樹脂のポリマーであることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】 小麦胚芽レクチンが固定化されたカラムを用いて、バイセクティングN-アセチルグルコサミンが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

【請求項 8】 小麦胚芽レクチンが固定化されたカラムを用いて、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

【請求項 9】 レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いて、フコースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

【請求項 10】 レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いて、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

【請求項 11】 疎水性クロマト用担体を用いて、ガラクトースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

【請求項 12】 疎水性クロマト用担体を用いて、補体依存性細胞障害活性または抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

【請求項 13】 疎水性クロマトカラムの官能基が、フェニル基である、請求項

12 記載の方法。

【請求項 14】 請求項 1～13 のいずれかに記載の方法を組み合わせて、所望の性質を有する免疫機能分子を精製する方法。

【請求項 15】 抗体がヒト IgG である、請求項 1～14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】 ヒト IgG のサブクラスが IgG1 である、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】 請求項 1～16 のいずれかに記載の方法で精製された抗体を有効成分とする医薬。

【請求項 18】 抗体がヒト IgG である、請求項 17 記載の医薬。

【請求項 19】 ヒト IgG のサブクラスが IgG1 である、請求項 18 記載の医薬。

【請求項 20】 免疫機能分子に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、各種疾患の診断方法。

【請求項 21】 免疫機能分子に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、各種疾患の予防方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、所望の性質を有する抗体を精製する方法に関する。また、本発明の精製方法により得られた抗体を有効成分とする医薬、および、抗体に結合する糖質に対し親和性を有する物質を用いた、各種疾患の予防方法または治療方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖蛋白質のうち、糖鎖構造が一般には蛋白質の外側向かって配位している糖蛋白質については、糖鎖に結合するレクチンを固定化したカラムを用いて精製することが出来る。レクチンには特定の糖鎖構造に対する特異性があることが知られている。

【0003】

小麦胚芽レクチンを用いて、糖鎖および糖ペプチドとの結合活性を調べたとこ

ろ、N-グリコシド結合糖鎖のうち、ハイブリッド型糖鎖やシアル酸を有する糖鎖または糖ペプチドとの結合性が高いことが示唆されている[Biochemistry), 16, 4426, 1977、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry), 254, 4000, 1979]。また、小麦胚芽レクチンは、バイセクティングN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖構造を有する糖ペプチドより強い結合活性を有することが示唆されている[Biochemistry), 20, 5894, 1981]。

【0004】

レンズマメレクチンは、単糖である α -D-マンノース、 α -D-グルコースを認識することが知られている[ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry), 268, 7668, 1993]。また、レンズマメレクチンが、N-グリコシド結合糖鎖のアスパラギンに最も近いN-アセチルグルコサミン残基にL-フコースが α 1, 6-結合した糖鎖構造を有する糖ペプチドに対して、強い結合性を示すことが知られている[カーボハイドレート・リサーチ (Carbohydrate Research), 40, 111, 1975、カーボハイドレート・リサーチ (Carbohydrate Research), 110, 283, 1982]。

【0005】

しかし、これらは、糖鎖または糖鎖構造を含んだペプチドとレクチンとが結合することを示しているにすぎない。

抗体の糖鎖構造は、Fc領域に埋もれた形、すなわち抗体の立体構造において糖鎖構造が抗体の内側に向いた形で存在する[ネイチャー (Nature), 264, 415-420, 1976]。

【0006】

ノセ (Nose) らは、セファロース (Sephacrose) 担体にレンズマメレクチン (以下、LCAと表記する) を固定化したカラムを用いても、マウスIgG2aを分離することができず、これはハイブリドーマ細胞 (12-6細胞) で生産させた通常のマウスIgG2aの糖鎖がFc領域に埋もれているためであると考察している。また、彼らはハイブリドーマ細胞12-6細胞をN型糖鎖の成熟化を阻害するスワインソニンで処理することにより、LCA固定化セファロースカラムを結合させることができた

が、これはマウスIgG2aの糖鎖がコンプレックス型糖鎖からハイブリッド型糖鎖になるため、糖鎖が抗体のFc領域より外に露出した結果によるものと考察されている。[ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology), 145, 910-914, 1990]。

【0007】

以上のとおり糖鎖構造を変化させることなく、糖鎖構造に着目して抗体を精製する方法はこれまでのところ知られていない。

ところで、抗体のFc領域に存在する糖鎖構造が、抗体の有する活性、具体的には抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC活性と表記する）、補体依存性細胞障害活性（以下、CDC活性と表記する）または生体内の安定性に関与している。

【0008】

非還元末端のガラクトース残基の付加により、抗体のCDC活性が上昇すること[モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 32, 1311, 1995; W098/58964]、抗体のバイセクティングN-アセチルグルコサミン結合糖鎖含量を増加させることにより、抗体のADCC活性が上昇すること[W099/54342]、シアル酸の含量を増加させると体内での安定性が高まること[ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotechnology), 17, 1116, 1999]などが知られている。しかしながら、これらの活性に相関する糖鎖構造に着目し、ADCC活性やCDC活性などのエフェクター活性、または体内における安定性などの所望の性質を有する抗体の精製方法はこれまでのところ知られていない。

【0009】

また、自己免疫疾患であるリウマチでは、患者の血中IgGのガラクトース量が減少することが知られている[グライココンジュゲート・ジャーナル(Glycoconjugate journal), 15, 929-934, 1998]。これまでのリウマチの診断方法としては、レクチンによるレクチンブロット法が用いられているが、生体内の抗体を変性させる工程などを含めて、操作が複雑である。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、抗体を糖鎖構造の相違により精製し、所望の性質を得ること

にある。このような手法があれば、生体内の抗体を精製し、各種疾患の診断に用いることが期待される。さらに、動物細胞等で生産した抗体から、所望のエフェクター活性をもつ抗体を精製することができる。この手法によって精製したエフェクター活性が高い抗体は、生体内の免疫系をより活性化できることが期待され、抗腫瘍効果をはじめとする、ヒトの各種疾患の治療上の有用性が期待される。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明は以下の(1)から(21)に関する。

(1) 抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いて所望の性質を有する抗体を精製する方法。

(2) 糖鎖が、N-グリコシド結合糖鎖である、上記(1)記載の方法。

(3) N-グリコシド結合糖鎖が、バイセクティングN-アセチルグルコサミン、フコースまたはガラクトースが結合した糖鎖である、上記(2)記載の方法。

(4) 糖鎖に対し親和性を有する物質が、レクチンであることを特徴とする上記(1)記載の方法。

(5) レクチンが、コンカナバリンA、小麦胚芽レクチンおよびレンズマメレクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種類のレクチンである、上記(4)記載の方法。

(6) 糖鎖に対し親和性を有する物質を結合させた担体が、合成樹脂のポリマーであることを特徴とする上記(1)記載の方法。

(7) 小麦胚芽レクチンが固定化されたカラムを用いて、バイセクティングN-アセチルグルコサミンが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

【0012】

(8) 小麦胚芽レクチンが固定化されたカラムを用いて、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

(9) レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いて、フコースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

(10) レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いて、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

(11) 疎水性クロマト用担体を用いて、ガラクトースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

(12) 疎水性クロマト用担体を用いて、補体依存性細胞障害活性または抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

(13) 疎水性クロマトカラムの官能基が、フェニル基である、上記(12)記載の方法。

【0013】

(14) 上記(1)～(13)のいずれかに記載の方法を組み合わせ、所望の性質を有する免疫機能分子を精製する方法。

(15) 抗体がヒトIgGである、上記(1)～(14)のいずれかに記載の方法。

(16) ヒトIgGのサブクラスがIgG1である、上記(15)記載の方法。

(17) 上記(1)～(16)のいずれかに記載の方法で精製された抗体を有効成分とする医薬。

(18) 抗体がヒトIgGである、上記(17)記載の医薬。

(19) ヒトIgGのサブクラスがIgG1である、上記(18)記載の医薬。

(20) 免疫機能分子に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、各種疾患の診断方法。

(21) 免疫機能分子に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、各種疾患の予防方法。

【0014】

【発明の実施の形態】

抗体は、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生される蛋白質で、抗原と特異的に結合する活性を有する。抗体としては、動物に抗原を免疫することにより得られた抗血清、動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌するモノクローナル抗体、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などいかなるものでもよい。また、抗体のFc領域を融合させた融合タンパク質なども含まれる。

【 0 0 1 5 】

具体的には、マウスに免疫したのち脾臓細胞から得られるマウス抗体、マウス抗体とヒト抗体の遺伝子を任意に組込んだ宿主細胞を用いて生産されるヒトーマウスキメラ抗体またはヒト化抗体などがあげられる。

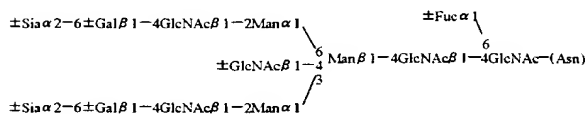
本発明の精製方法で精製するために用いられる物質としては、血清などの体液、抗体を生産する細胞を培養した後、細胞を除去して得られる溶液等があげられる。該物質としては、カラムに通塔する際に他の糖蛋白質が共存していない溶液が好適に用いられる。具体的には、従来の抗体の精製方法、例えばプロテインAなどによる精製で予め粗精製された溶液などがあげられる。無血清または無蛋白培地で抗体生産させる細胞を培養した後、細胞を除去して得られる溶液については、そのままカラムに通塔させることができる。

【0 0 1 6】

抗体のFc領域には、後述するN-グリコシド結合糖鎖がそれぞれ1カ所ずつ結合する領域を有しているので、抗体1分子あたり2本の糖鎖が結合している。抗体に結合するN-グリコシド結合糖鎖としては、化合物（I）で示されるいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する2本のN-グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。したがって、これまでの精製抗体とは、アミノ酸配列の観点からは同一であるが、それらの精製抗体のFc領域に結合した糖鎖構造には種々の糖鎖がみられる。

【 0 0 1 7 】

【化 1】



(I) 糖鎖としては、直鎖または分岐したオリゴ糖または多糖であればいずれも包含されるが、例えば蛋白質との結合様式により、アスパラギンと結合するN-グリコシド結合糖鎖、セリン、スレオニンなどと結合するO-グリコシド結合糖鎖に大別される。N-グリコシド結合糖鎖としては、ハイマンノース型、コンプレ

ックス型、ハイブリッド型の3つの種類があげられる。

【0018】

オリゴ糖は、単糖や、単糖の置換誘導体が脱水結合して生じた糖質で、単糖が2～10個が結合しているものをいう。さらに多数の単糖が結合している糖質を多糖という。多糖は、構成糖の種類によって異なるが、ウロン酸やエステル硫酸を多く含む糖質を酸性多糖、中性糖のみのものを中性多糖という。多糖のうち、ムコ多糖とよばれる一群の多糖は、ほとんどが蛋白質と結合しており、プロテオグリカンという。

【0019】

単糖とは、糖鎖の構成単位となるもので、加水分解によってそれ以上簡単な分子にならない基本的物質である。単糖は、カルボキシル基などの酸性側鎖を有する酸性糖、ヒドロキシル基がアミノ基で置換されたアミノ糖、それ以外の中性糖の3つに大別される。生体内に存在する単糖としては、酸性糖はN-アセチルノイラミン酸やN-グリコリルノイラミン酸などのシアル酸や、ウロン酸など、アミノ糖はN-アセチルグルコサミンやN-アセチルガラクトサミンなど、中性糖はグルコース、マンノース、ガラクトース、フコースなどがあげられる。

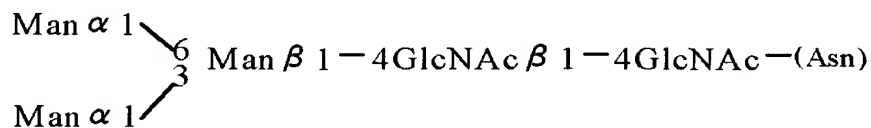
【0020】

抗体に結合する糖鎖としては、N-グリコシド結合糖鎖の3つの型のいずれも包含する。

N-グリコシド結合糖鎖は、以下に示す基本となる共通のコア構造を有する。

【0021】

【化2】



(II)

上記の構造において、アスパラギンと結合する糖鎖の末端を還元末端、反対側を非還元末端という。

【0022】

糖鎖に親和性を示す物質としては、糖鎖と結合する性質を有する物質であればいかなるものでもよい。具体的には、蛋白質、抗体、低分子化合物などがあげられる。

糖鎖に親和性を示す蛋白質としては、マンノース結合タンパク質、繊維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子などの糖結合蛋白質、レクチン、レクチン様物質などがあげられる。

【0023】

レクチンとは、動植物をはじめとして微生物などあらゆる生物中に存在する、糖質に親和性を有する蛋白質の総称である。レクチンは、以下①～③のように定義されている。

- ①糖質に結合し、細胞を凝集あるいは複合糖質を沈降させる。
- ②非免疫学的な産物である。
- ③細胞や複合糖質との結合は、単糖またはオリゴ糖により阻止される。

【0024】

複合糖質としては、糖質を含む生体分子の総称で、糖蛋白質、プロテオグリカン、糖脂質を意味する。

レクチンとしては、具体的には、ナタ豆（英名Jack bean、学名Conavalia ensiformis）由来のコンカナバリンA（Concanavarin A:以下ConAと表記する）、小麦胚芽（英名Wheat germ、学名Triticum vulgare）由来の小麦胚芽レクチン（以下WGAと表記する）、レンズマメ（学名Lens culinaris）由来のレンズマメレクチン（以下LCAと表記する）などがあげられる。

【0025】

ConAは、 α -D-マンノース、 α -D-グルコースを認識する。N-グリコシド結合糖鎖に強く結合するため、最も汎用されているレクチンである。

WGAは、ハイブリッド型糖鎖やシアル酸をもつ糖蛋白質との結合性が高く、バイセクティングN-アセチルグルコサミンの存在により強く結合する。

LCAは、 α -D-マンノース、 α -D-グルコースを認識する。N-グリコシド結合糖鎖のアスパラギンに最も近いN-アセチルグルコサミン（以下、GlcNAcと略記する）残基にL-フコースが α 1,6-結合した構造に強い結合性を示す。

【0026】

糖鎖に親和性を示す抗体としては、動物に糖鎖を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する糖質に対するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体から抗体遺伝子を取得し、該抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを宿主細胞へ導入し、該宿主細胞から生産することにより取得された、糖質に親和性を示す遺伝子組換え体抗体などいかなるものでもよい。

【0027】

具体的には、マウスに免疫したのち脾臓細胞から得られるマウス抗体、マウス抗体とヒト抗体の遺伝子を任意に組込んだ宿主細胞を用いて生産されるヒトーマウスキメラ抗体あるいはヒト化抗体、およびそれらの抗体フラグメントであるFab、Fab'、F(ab)₂、一本鎖抗体、ジスルフィド抗体断片などがあげられる。

また、それらの抗体をペプシン等の酵素処理および／または還元処理することにより得られたFab、Fab'、F(ab)₂などの抗体フラグメントも包含される。

【0028】

さらに、ファージディスプレイなどの手法によって得られる、糖鎖に親和性を示すペプチド、蛋白質も包含される。

糖鎖に親和性を示す低分子化合物としては、セロトニン、フェニルほう酸等があげられる。また、糖鎖に親和性を有する官能基を結合させた担体なども包含される。セロトニンは、シアル酸に親和性を有する低分子化合物である。

【0029】

長い糖鎖を有している抗体は、水酸基数が多くなるために疎水性が低くなり、短い糖鎖を有している抗体は、水酸基数が少なくなるために疎水性が高くなる。糖鎖に親和性を有する官能基としては、フェニル基、ブチル基、オクチル基など疎水性官能基があげられる。これらの官能基を結合させた担体を用いることにより、化合物(I)で示された非還元末端側の糖の付加が少ない糖鎖構造を有する抗体を精製し、取得することができる。

【0030】

糖鎖に対し親和性を有する物質を、樹脂、膜等の担体に直接または間接的に結合させた器材を用いて、クロマトグラフィー等を行うことにより所望の性質を有

する抗体を精製することができる。

担体としては、合成樹脂ポリマー、好ましくはアクリル系合成樹脂ポリマーまたはビニル系合成樹脂ポリマー、より好ましくはアクリル酸エステルがあげられる。

【0031】

所望の性質としては、CDC活性、ADCC活性など抗体のエフェクター活性または体内における安定性などがあげられる。

CDC活性とは、抗原に結合した抗体に補体が結合して膜障害性蛋白複合体を形成し、微生物などの膜に穴をあけたり、マクロファージや好中球に捕食されるように働く活性を意味する。ADCC活性とは、腫瘍細胞等に結合した抗体が、抗体Fc領域とキラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在するFcレセプターの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性を意味する。

【0032】

また、所望の性質には、抗体の有する糖鎖構造の均一性なども含まれる。

以上にあげた所望の性質は、抗体の有する糖鎖構造に起因する。具体的には、還元末端のGlcNAcへ1, 6結合するフコースを持たない糖鎖構造、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖構造を有する抗体は、ADCC活性が高い。ガラクトースを有する糖鎖構造を有する抗体は、CDC活性、ならびにADCC活性が高い。シアル酸の含量を増加させた糖鎖構造を有する抗体は体内での安定性がよい。また、シアル酸うち、N-グリコリルノイラミン酸（以下、Neu5Gcと略記する）を持たない糖鎖を有する抗体は、免疫原性が低い。

【0033】

以下、本発明の精製、評価および使用方法について具体的に例示する。

1. 抗体の精製

(1) レクチンクロマトグラフィーによる精製

レクチンクロマトグラフィーは、レクチンが糖質と特異的に結合する性質を利用した、アフィニティークロマトグラフィーである。

【0034】

所望の性質を有する抗体を精製するために用いるレクチンの種類としては、例えば、所望の性質がCDC活性である場合はLCA、WGA等、ADCC活性の場合はLCA等、所望の性質を有する抗体の糖質構造により選択することができる。

所望の性質を有する抗体の糖質構造が明らかな場合には、上述したレクチンの特異性を参考にしてレクチンを選択する。

【0035】

所望の性質を有する抗体の糖質構造が不明な場合は、ビオチン、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase) 等で標識されたレクチンを用いて、ドットブロット法 (アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 204(1), 198, 1992) やウエスタンブロット法 (法医学の実際と研究, 37, 155, 1994) 等を行うことにより、結合性のあるレクチンを選択することができる。

【0036】

1分子に複数本の糖鎖が存在する糖蛋白質では、レクチンとの結合がより強固になり、カラムから溶出しにくい場合がある。その場合、溶出液の糖濃度を高くすることにより溶出されやすくなるが、糖蛋白質との結合の弱い別のレクチンを選択する方が好ましい。

レクチンクロマトグラフィーに用いるカラムとしては、具体的には、HiTrap ConA、HiTrap Lentil Lectin (LCA)、HiTrap Wheat Germ Lectin (WGA) (以上、Pharmacia社製) などがあげられる。また、微生物、植物、動物等の生体試料から単離したレクチンを、担体に固定化したカラムを用いてもよい。担体としては、アガロース、アクリル系合成樹脂のポリマー (例えばアクリル酸エステルポリマー) などがあげられる。高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLCと表記する) システムを使用する場合は、一般に市販されているHPLCシステムであればいかなるものでもよい。例えば、LC-6A (Shimadzu社製) などがあげられる。

【0037】

HPLCシステムを使用した精製方法の一例を示す。溶離液は、10~100mmol/l トリス-硫酸緩衝液、10~100mmol/l 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液などを用いる。pHは7~8程度の間が好ましい。まず、10~100mmol/l トリス-硫酸緩衝液または10

～100mmol/l酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液などの初期緩衝液でカラムを十分に平衡化する。HPLCシステムにより試料を通塔し、溶出糖を含む10～100mmol/lトリス-硫酸緩衝液または10～100mmol/l酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を用いて溶出させる。溶出糖はレクチンによって異なる。例えば、ConAカラムの場合は、溶出糖として0.02～0.5mol/lメチル α -D-グルコシドや0.02～0.5mol/lメチル α -D-マンノシドを用いる。溶出はステップワイズ法またはグラジエント法により溶出する。蛋白質の検出は、例えば紫外線吸収、電気泳動などの方法で検出することができる。

(2) 疎水性クロマトグラフィーによる精製

疎水性クロマトグラフィーは、蛋白質の疎水性の違いにより分離する手法である。一般的には、目的蛋白質と夾雑蛋白質との疎水性の違いを利用して、目的蛋白質を分離する場合に用いられている。

【0038】

同一蛋白質の疎水性クロマトグラフィーを行う場合、溶出時間の違いによって蛋白質の有する糖鎖構造の違いや、二量体含量の相違が見られる場合がある。これは、蛋白質の立体構造が変化することにより、疎水性に差異が生じるためである。

疎水性クロマトグラフィーに使用するカラムとしては、一般には市販されている疎水性クロマトグラフィーのカラムであればいかなるものでもよい。例えば、HiTrap 16/10 Phenyl (Pharmacia社製)、TSK-gel Phenyl-5PW (TOSOH社製)などがあげられる。

【0039】

HPLCシステムを使用する場合は、一般に市販されているHPLCシステムであればいかなるものでもよい。例えば、LC-6A (Shimadzu社製)などがあげられる。

HPLCシステムを使用した精製方法の一例を示す。溶離液には、10～100mmol/lクエン酸-グリシン緩衝液または10～100mmol/lりん酸ナトリウム緩衝液などを用いる。pHは5～8程度の間、好ましくはpH7前後とする。まず、硫酸アンモニウム（以下、硫安と表記する）0.5～1mol/l程度を含む10～100mmol/lクエン酸-グリシン緩衝液または10～100mmol/lりん酸ナトリウム緩衝液などの初期溶離液で充

分カラムを平衡化する。HPLCシステムにより試料を通塔し、10～100mmol/lクエン酸-グリシン緩衝液または10～100mmol/lりん酸ナトリウム緩衝液などの溶出緩衝液で溶出させる。溶出はステップワイズ法またはグラジエント法により溶出する。蛋白質の検出は、例えば紫外線吸収、電気泳動などの方法に検出することができる。

【0040】

2. 抗体の評価方法

上記1の方法により得られた抗体の活性測定、また抗体に結合する糖質の分析については下記の方法を用いることができる。

(1) 抗体の活性評価

上記1で精製された抗体と抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373, 1993]等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定し、評価することができる[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373, 1993]。更にヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

【0041】

(2) 抗体の糖鎖の分析方法

抗体の糖鎖構造の解析方法としては、2次元糖鎖マップ法[アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73, 1988、生物化学実験法23-糖蛋白質糖鎖研究法(学会出版センター) 高橋禮子編(1989)]があげられる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖の結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

【0042】

具体的には、抗体である抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン(以下、PAと略記する)による糖鎖の蛍光標識[ジャーナル・

オブ・バイオケミストリー (J.Biochem.) , 95, 197, 1984]を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。ついで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa社製) [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal.Biochem.) , 171, 73, 1988] とのスポットの比較により糖鎖構造を推定することができる。

【0043】

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される糖鎖構造を確認することができる。

3. 抗体の使用方法

(1) 本発明の精製方法で取得された抗体を有効成分として含有する医薬

上記1の方法で精製された抗体を、上記2の評価方法により抗体の性質を確認する。

【0044】

上記1(1)のLCAを用いて精製された抗体、すなわち還元末端のGlcNAcへ α 1, 6結合するフコースを持たない糖鎖構造を有する抗体、上記1(1)のWGAを用いて精製された抗体、すなわちバイセクティングGlcNAcを有する糖鎖構造を有する抗体は、ADCC活性が高い。したがって、このような性質を有する抗体は、癌、アレルギー、循環器疾患、またはウイルスあるいは細胞感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

【0045】

通常の抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高いADCC活性を有しておれば癌細胞を傷害することにより癌を治療することができるので、通常の抗癌剤よりも有用である。

アレルギー反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高いADCC活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応をおさえることができる。

【0046】

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。バルーンカテーテルによる

治療後に再狭窄が発生することがある。高いADCC活性を有する抗体を用いて動脈細胞の増殖をおさえることにより、循環器疾患を予防および治療することができる。

高いADCC活性を有する抗体を用いてウイルスまたは細菌に感染した細胞の増殖を押さえることにより、ウイルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

【0047】

上記1(1)のLCAを用いて精製された抗体のうち、還元末端のGlcNAcへ α 1,6結合するフコースを有する糖鎖構造を有する抗体は、上述した抗体よりもADCC活性が低くなる。このように、ADCC活性が抑制された抗体は、自己免疫疾患において亢進された免疫反応を押さえるという観点から、自己免疫疾患の予防および治療において有用である。

【0048】

上記1(2)の疎水クロマトグラフィーによって精製された抗体のうち、グルコースを有する糖鎖構造を多くを有する抗体は、CDC活性、ならびにADCC活性が高い。したがって、このような性質を有する抗体は、癌、アレルギー、循環器疾患、またはウイルスあるいは細胞感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

【0049】

上記1(2)の疎水クロマトグラフィーによって精製された抗体のうち、グルコースを有する糖鎖構造が少ない抗体は、精製する前の抗体よりもCDC活性、ならびにADCC活性が低くなる。このように、CDC活性、ADCC活性が抑制された抗体は、自己免疫疾患において亢進された免疫反応を押さえるという観点から、自己免疫疾患の予防および治療において有用である。

【0050】

また、これらの糖鎖構造、ならびに糖鎖構造に起因する抗体の性質は、混合されていてもかまわない。そのような抗体を精製する手法としては、具体的には、糖鎖に親和性を示す物質を固定化したカラムを組み合わせたり、糖鎖への結合特異性が異なる物質を同一カラム内に混合して作製したカラムを用いても構わない。

【0051】

(2) 抗体に結合する糖質に対し親和性を有する物質を用いた診断方法または予防方法

糖質に親和性を示す物質を用いて、ヒト体内から生体試料を抽出し、該生体試料中の抗体の検出または定量を行うことにより、各種疾患の診断または予防を行うことができる。また、ヒト体内の抗体の検出または定量を行うことにより、ヒトの生理機能の変化、疾患の進行状況等を診断することができる。

【0052】

方法としては、本発明における抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を結合させた担体をカラムに充填する。該カラムにヒト体内から採取した生体試料を通塔させ、データを取ることにより、抗体に結合する種々の糖鎖構造の割合を検出または定量することができる。抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を結合させた担体を充填したカラムに、抗体を特異的に吸着させる性質を有するプロテインAを充填したカラムを組み合わせることにより、リウマチ等の疾患などを、より特異的に、かつ簡便に診断することができる。

【0053】

具体的には、自己免疫疾患であるリウマチの診断があげられる。

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

【0054】

【実施例】

実施例1. フコース結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

フコースをもつ糖鎖に結合するレクチンカラム (LA-LCA4.6x150mmホーネンコーポレーション社) を用いて、W097/10354記載の方法に従ってラットミエローマYB2/0細胞で生産させた抗hIL-5R α CDR移植抗体の分離を行った。HPLCシステムはShimadzu社製LC-6Aを用い、流速は0.5ml/分、カラム温度は室温で行った。カラムを50mMトリス-硫酸緩衝液(pH7.3)で平衡化し、精製された抗hIL-5R α CDR移

植抗体を注入後、50mM トリス-硫酸緩衝液 (pH7.3) 中 0 M から 0.2M の α -メチルマンノシド (ナカライテスク社製) によるリニアグラジエント (60 分間) にて溶出した。抗 hIL-5R α CDR 移植抗体は非吸着画分と吸着画分とに分画した (図 1)。

【0055】

(2) 結合活性測定 (ELISA 法)

図 1 中に示した非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5R α に対する結合活性を、ELISA 法により測定した。W097/10354 に記載の抗 hIL-5R α マウス抗体 KM1257 (FERM BP-5133) を PBS で $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度に希釈した溶液の $50 \mu\text{l}$ を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、 4°C で 20 時間反応させた。反応後、1% BSA-PBS を $100 \mu\text{l}$ / ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1% BSA-PBS を捨て、W097/10354 に記載の可溶性 hIL-5R α を 1% BSA-PBS で $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度に希釈した溶液を $50 \mu\text{l}$ / ウェルで加え、 4°C で 20 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型 CDR 移植抗体の各種希釈溶液を $50 \mu\text{l}$ / ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1% BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、 $50 \mu\text{l}$ / ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 (2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム の 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を $1 \mu\text{l/ml}$ で添加した溶液) を $50 \mu\text{l}$ / ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。

測定の結果、非吸着画分と吸着画分の一部は、分離前の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体同様と結合活性を示した (図 2)。

【0056】

(3) *in vitro* 細胞障害活性 (ADCC 活性)

非吸着画分と吸着画分の一部の ADCC 活性を測定した。まず、標的細胞溶液の調製を行った。W097/10354 に記載の hIL-5R α 鎖及び β 鎖を発現しているマウス T 細胞株 CTLL-2 (h5R) を RPMI1640-FBS (10) 培地で培養し、 1×10^6 細胞 / 0.5ml となる様に調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 1.5 時間反応

させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10)培地で懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10)培地を5ml加え、 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

【0057】

次に、エフェクター細胞溶液の調製を行った。健常人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをPolymorphprep（Nycomed Pharma AS社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10)培地で3回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 9×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

【0058】

96ウェルU字底プレート（Falcon社製）の各ウェルに、調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{l}$ （ 1×10^4 細胞/ウェル）を分注した。次いで調製したエフェクター細胞溶液を $100 \mu\text{l}$ （ 9×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は90:1となる）添加した。更に、各種抗hIL-5R α CDR移植抗体を各最終濃度 $0.001 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ となる様に加え、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC活性は下式により求めた。

【0059】

$$\text{ADCC活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}} \times 100$$

その結果を図3に示した。非吸着画分は分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体よりADCC活性が高く、吸着画分の一部は分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体よりも低いAD

CC活性を示した。

【0060】

(4) 糖鎖解析

非吸着画分、吸着画分の一部をヒドラジン分解により糖鎖を蛋白質から切断した[メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。ヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えてN-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197, 1984]。蛍光標識した糖鎖群 (PA化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30カラム (Pharmacia社製) を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製PA化糖鎖群とした。次に、CLC-ODSカラム (Shimadzu社製) を用いて、精製PA化糖鎖群の逆相HPLC分析を行った(図4)。PA化糖鎖群は、39分から75分の範囲に溶出した。ピーク面積から計算すると、非吸着画分はフコースのない糖鎖が100%、吸着画分の一部はフコースのない糖鎖が18%であった。分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体ではフコースのない糖鎖が37%であった。このことから、フコースを有する糖鎖に結合するレクチンカラムを用いて、分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体よりもフコースのない糖鎖の含量が多い抗体とフコースのない糖鎖の含量が少ない抗体とを分離・精製することができた。

【0061】

実施例2. バイセクティングGlcNAc結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

バイセクティングGlcNAcをもつ糖鎖に結合するレクチンカラムLA-WGA4.6x150mm (ホーネンコーポレーション社製) を用いて、ラットミエローマYB2/0細胞で生産させた抗hIL-5R α CDR移植抗体の分離を行った。HPLCシステムはShimadzu社製LC-6Aを用い、流速は0.5ml/分、カラム温度は室温で行った。50mMトリス-硫酸緩衝液(pH7.3)で平衡化し、精製された抗hIL-5R α CDR移植抗体を注入後、50mMトリス-硫酸緩衝液(pH7.3)中0Mから0.2MへのGlcNAc(純正化学社製)によるリニアグラジエント(60分間)にて溶出した。抗hIL-5R α CDR移植抗体を、2～5分間に溶出された画分(早く溶出された画分)と8～12分間に溶出された画分(遅く溶出

された画分)に分離した。

【0062】

(2) 糖鎖解析

早く溶出された画分および遅く溶出された画分の抗体の糖鎖解析を、実施例1の(4)項に示す方法で行った。PA化糖鎖群は、20分から50分の範囲に溶出した。その結果、遅く溶出された画分の抗hIL-5R α CDR移植抗体は、精製・分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体と比較して、バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖の含量が、6%から12%に増加した(図5)。

【0063】

実施例3 フコースを有する糖鎖が少なく、バイセクティングGlcNAc結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

実施例2で得られ、かつバイセクティングGlcNAc結合糖鎖を多く含んだ遅く溶出された画分を、実施例1の(1)項の方法で分離した。非吸着画分と吸着画分の一部に分離した。

【0064】

(2) 糖鎖解析

非吸着画分と、吸着画分の一部の糖鎖解析を、実施例1の(4)項に示す方法で行った。PA化糖鎖群は、18分から45分の範囲に溶出した。その結果、吸着画分の一部は、分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体と比較して、フコースのない糖鎖の含量が29%から15%に減少し、バイセクティングGlcNAc結合糖鎖が5%から18%に増加した(図6)。

【0065】

実施例4 ガラクトース結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) 疎水性クロマトグラフィーによる抗体の分画

ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ[J. Immunol. Method], 167, 271-278, 1994]記載の方法を用いてラットミエローマYB2/0細胞で生産させた抗ガングリオシドGD3ヒト型キメラ抗体を、疎水性カラムであるPhenyl-5PW(東ソー社製)を用いて分離を行った。HPLCシステムはShimadzu社製LC-6Aを用い、流

速は1ml/分、カラム温度は室温で行った。1M硫酸を含む20mMりん酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で平衡化し、精製された抗ガングリオシドGD3ヒト型キメラ抗体を注入後、20mMりん酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)へのリニアグラジエント(60分間)にて溶出した。抗hIL-5R α CDR移植抗体を、4～6分間に溶出された画分(早く溶出された画分)と20～25分間に溶出された画分(遅く溶出された画分)とに分離した。

【0066】

(2) 糖鎖解析

早く溶出された画分および遅く溶出された画分の糖鎖解析を、実施例1の(4)項に示す方法で行った。PA化糖鎖群は、33分から70分の範囲に溶出した。その結果、早く溶出された画分はガラクトース結合糖鎖の含量が53%、遅く溶出された画分は、ガラクトース結合糖鎖の含量44%であった。(図7)。

【発明の効果】

本発明により、抗体を精製することによりその活性を調節することができる。また、生体試料から抗体を精製する方法と同様の方法を用いることにより、各種疾患を診断することができる。さらに、動物細胞等で生産させた抗体から、所望の活性を持つ抗体を精製し、該抗体を用いて各種免疫反応を調節する方法が提供される。上記の活性を調節した抗体は、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療に有用である。また、血中からのクリアランスを制御することで各種疾患の治療に用いる際の薬効を調節できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】は抗hIL-5R α CDR移植抗体を、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンが固定化されたカラムによって分離した溶離図を示したものである。縦軸にUV280nmにおける吸光度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

【図2】はフコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体のhIL-5R α との結合活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はhIL-5R α との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。◆が非吸着画分、■が吸着画分の一部、▲が分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体をそれぞれ示す。

【図3】はフコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体の、hIL-5R発現マウスT細胞株CTL-2(h5R)に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。◆が非吸着画分、■が吸着画分の一部、▲が分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体をそれぞれ示す。

【図4】はフコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。上図に非吸着画分の溶離図、中央図に吸着画分の一部、下図に分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「- Fuc」はフコースを持たない糖鎖群、「+Fuc」はフコースが結合した糖鎖群を示す。

【図5】は分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体と、バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖に結合するレクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて、遅く溶出される画分から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体、下図に遅く溶出される画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中の「Bisecting」はバイセクティングGlcNAcが結合した糖鎖群を示す。

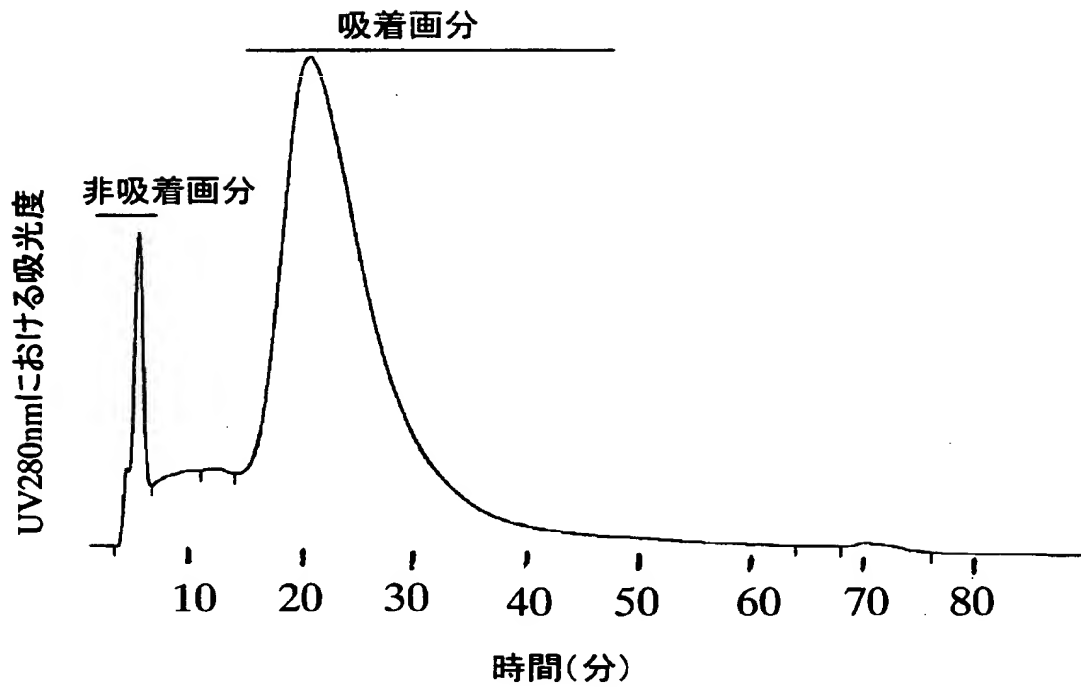
【図6】は分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体と、バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖に結合するレクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて遅く溶出され、さらにフコースを持つ糖鎖に結合するレクチンを用いたクロマトグラフィーを行って分画した抗体のうち、吸着画分の一部から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗hIL-5R α CDR移植抗体、下図に遅く溶出される画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「- Fuc」はフコースを持たない糖鎖群、「Bisecting」はバイセクティングGlcNAcが結合した糖鎖群を示す。

【図7】は早く溶出される画分、遅く溶出される画分から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。左図に早く溶出される画分、右図に遅く溶出される画分をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横

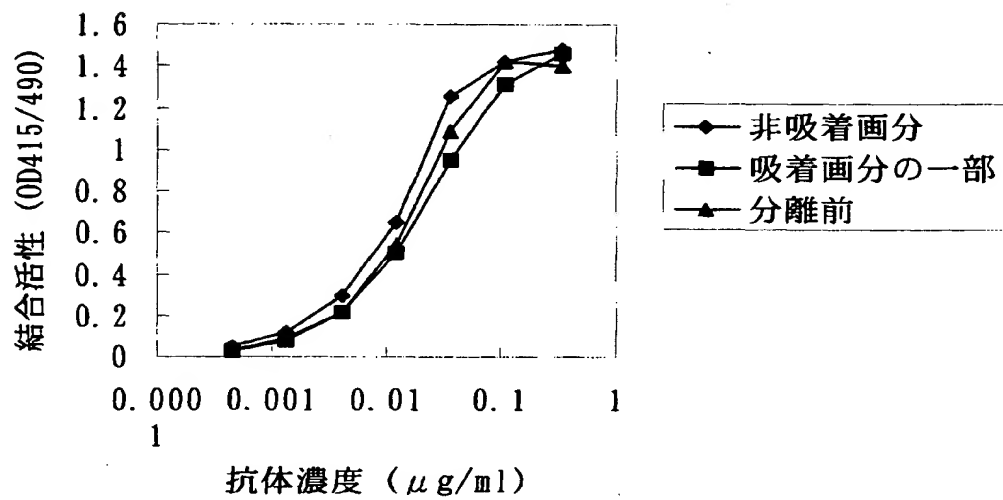
軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中斜線で示すピークはガラクトースを持たない糖鎖群、黒塗りで示すピークはガラクトースが結合した糖鎖群を示す。

【書類名】 図面

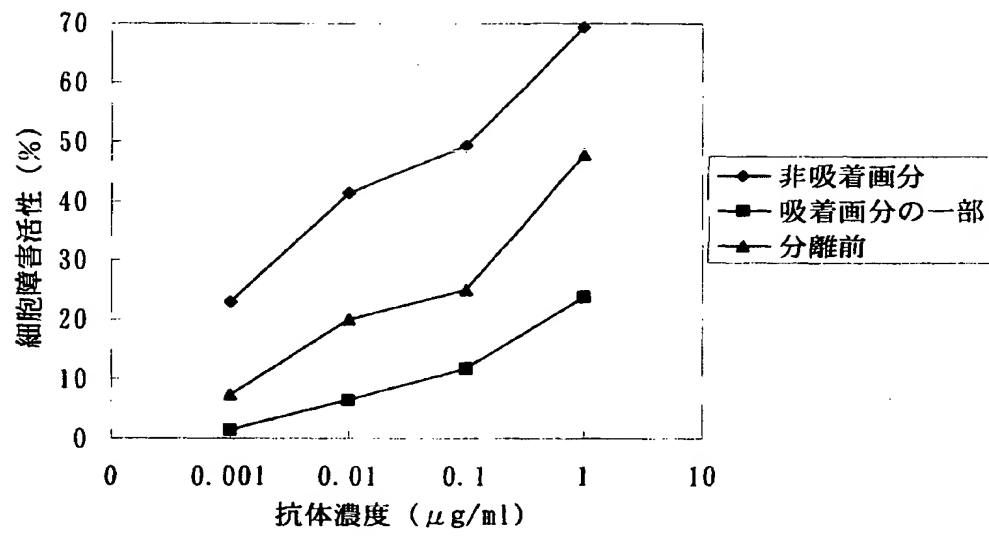
【図 1】



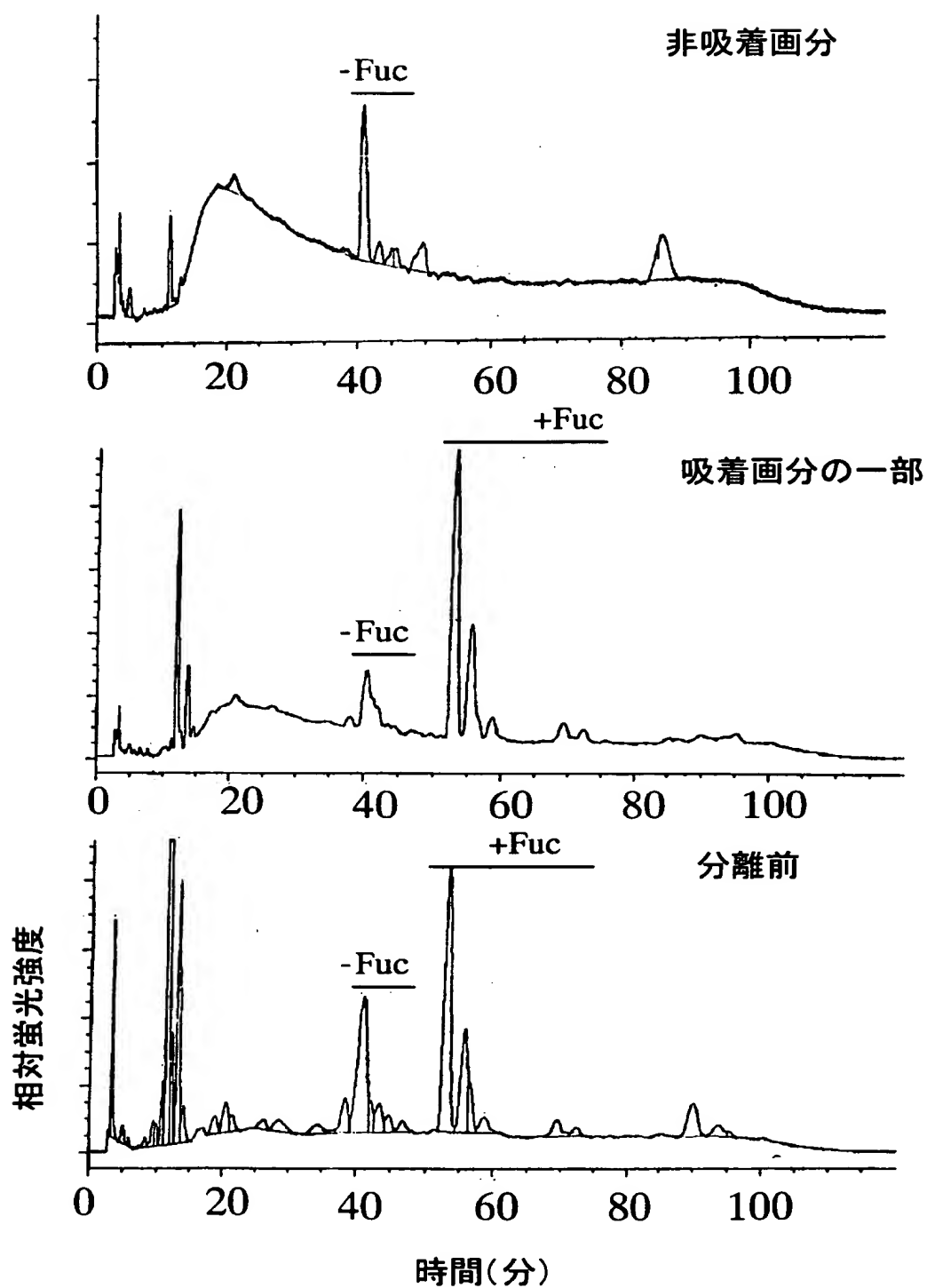
【図 2】



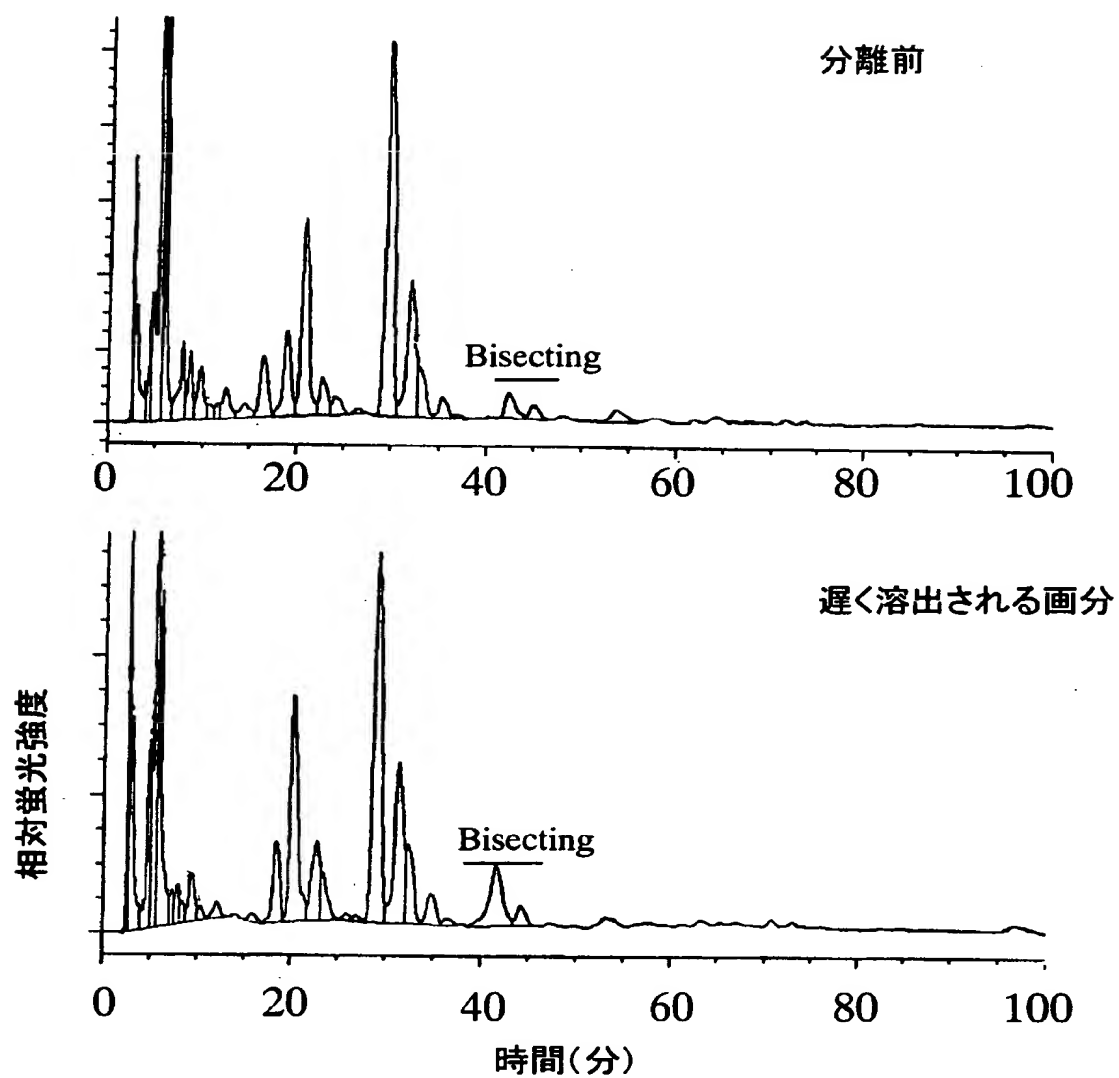
【図 3】



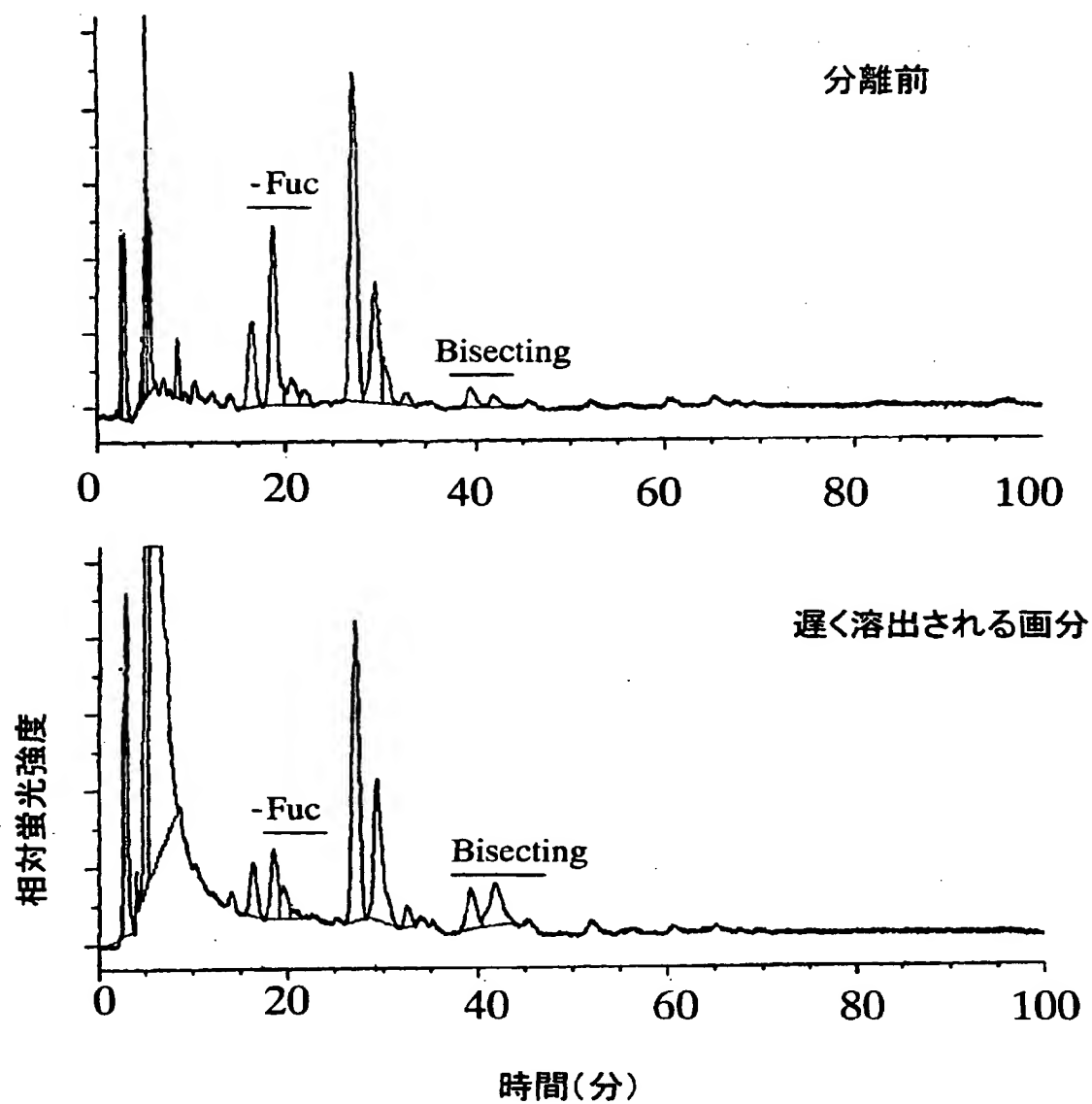
【図 4】



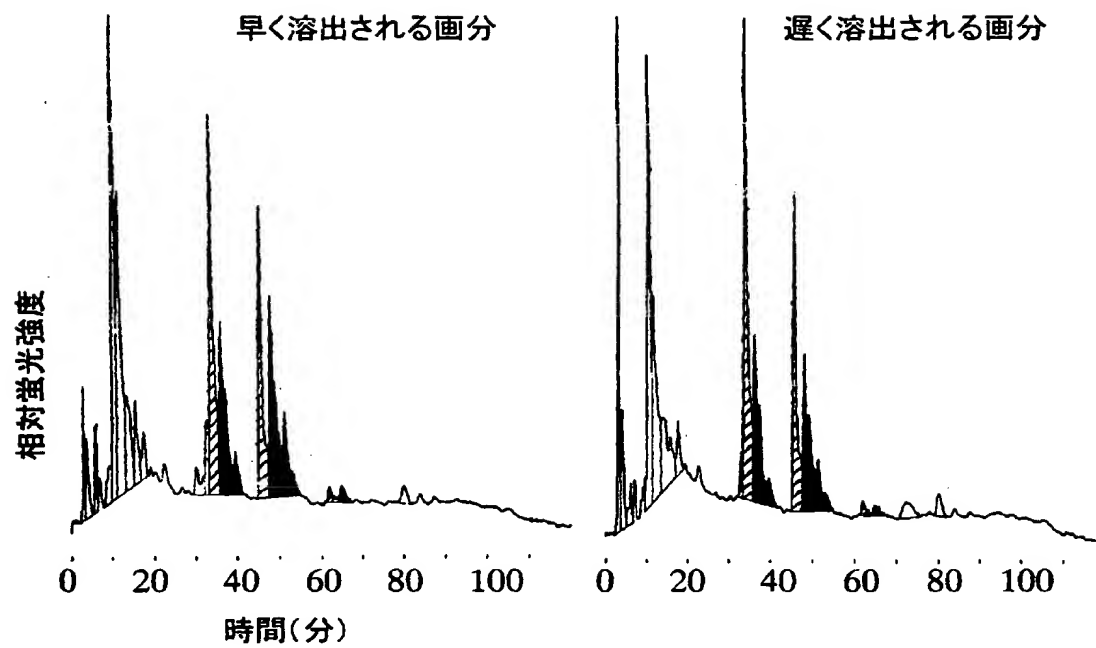
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ADCC活性やCDC活性などのエフェクター活性、または体内における安定性などの所望の性質を有する抗体を得ること。

【解決手段】 抗体の結合する糖鎖に対し、親和性を有する物質を用いて、所望の性質を有する抗体を精製することができる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 0 - 3 0 8 2 5 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 1 0 2 9]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 6 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号
氏 名	協和醗酵工業株式会社